



ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA DEL GENOMA DE *Rhizobium leguminosarum*: IDENTIFICACIÓN DE SISTEMAS GÉNICOS IMPLICADOS EN TRANSPORTE DE METALES

Burruezo, Silvia

Tutora: Brito, Belén¹

¹Departamento de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico: s.burruezo@alumnos.upm.es

RESUMEN

La asociación *Rhizobium*-leguminosa constituye una de las interacciones planta-microorganismo más específicas y beneficiosas a nivel medioambiental debido a su capacidad promotora del crecimiento vegetal en condiciones de deficiencia de nitrógeno. Se sabe que la resistencia a las condiciones de stress del suelo es un factor clave para la competitividad y desarrollo de eficientes interacciones diazotróficas en bacterias endosimbióticas de leguminosas. La presencia de metales pesados en el suelo es una de estas condiciones de stress que más afecta a la eficiencia de la fijación de nitrógeno. Actualmente, se dispone de escasa información sobre los sistemas implicados en resistencia a metales pesados en estas bacterias. En este trabajo se ha analizado experimentalmente los niveles de resistencia a metales, como níquel y cobalto, en la colección de cepas de *R. leguminosarum* existente en el laboratorio y se ha realizado un estudio bioinformático de la secuencia del genoma de la bacteria endosimbiótica de leguminosas 3841 de *Rhizobium leguminosarum* con objeto de identificar sistemas génicos potencialmente implicados en el transporte y resistencia a metales pesados.

Palabras clave: simbiosis, níquel, cobalto

INTRODUCCIÓN

Las bacterias endosimbióticas de la familia *Rhizobiaceae* (géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*) son capaces de fijar nitrógeno atmosférico y realizar su conversión en amonio mediante la acción de la enzima nitrogenasa (Verma *et al.*, 1992). El beneficio derivado de esta asociación simbiótica radica en la transferencia del nitrógeno amoniacal a la planta, lo que reduce la adición de fertilizantes nitrogenados, con los consiguientes beneficios agrícolas, económicos y medioambientales. Es por ello que las leguminosas constituyen cultivos imprescindibles para el consumo animal y humano, que además están siendo muy utilizados en planes de recuperación de suelos degradados.

La contaminación de suelos agrícolas por metales pesados procedentes de los lodos de depuradoras y residuos de actividades mineras o industriales es un grave problema medioambiental con efectos negativos muy significativos sobre la población microbiana del suelo (Giller *et al.*, 1998). Al mismo tiempo, algunos de estos metales son esenciales para el mantenimiento de las funciones celulares bacterianas. Por ello, los microorganismos han desarrollado diversos y sofisticados mecanismos de transporte y extrusión de metales. Estudios recientes han demostrado que la contaminación por metales pesados afecta a la actividad de las bacterias endosimbióticas de leguminosas y a su capacidad de fijación de nitrógeno (Chaudri *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2006), si bien se dispone de escasa información sobre los sistemas implicados en la captación y resistencia a metales pesados en estas bacterias.

El objetivo general de la línea de investigación consiste en identificar y caracterizar sistemas génicos de la bacteria endosimbiótica *R. leguminosarum* 3841 que estén implicados en el aprovisionamiento de metales en el interior de la planta, así como en la



resistencia a los mismos con objeto de favorecer el establecimiento de simbiosis eficientes y la supervivencia bacteriana en condiciones de stress en el suelo. Dentro de este objetivo general, en este trabajo se abordan dos objetivos específicos. En primer lugar determinar los rangos máximos y mínimos de resistencia a níquel y cobalto en esta especie bacteriana y precisar los niveles de resistencia de la cepa 3841 para su uso en el estudio molecular de sistemas de homeostasis de estos metales. Como segundo objetivo específico se realizará una búsqueda bioinformática de sistemas génicos potencialmente implicados en el transporte y resistencia a metales en el genoma de la cepa 3841 de *R. leguminosarum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico. Para el trabajo se seleccionaron 34 cepas de *R. leguminosarum* de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología de la E.T.S. Ingenieros Agrónomos cuyos códigos son: UML2, UPM730, UPM789, UPM791, UPM844, UPM867, UPM868, UPM869, UPM915, UPM916, UPM1025, UPM941, UPM942, UPM944, UPM945, UPM947, UPM948, UPM949, UPM950, UPM958, UPM981, UPM1050, UPM1055, UPM1060, UPM1063, UPM1070, UPM1071, UPM1071, UPM1074, UPM1090, UPM1102, UPM1131, UPM1137, UPM1221. Esta última cepa corresponde con la cepa 3841 de *R. leguminosarum* de la cual se encuentra disponible la secuencia completa de su genoma.

Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano. Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas de rizobios fueron YMB (Vincent, 1970) y TY (Beringer, 1974). El análisis de la resistencia a níquel y cobalto en las cepas de *R. leguminosarum* se realizó mediante siembra en placas de medio TY suplementadas con diversas concentraciones de NiCl_2 y CoCl_2 . Las placas se incubaron durante 7 días a 28°C. La capacidad de crecimiento en presencia de níquel y cobalto mediante el método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Para estos ensayos se utilizaron cultivos en fase exponencial, los cuales se inocularon en profundidad en medio TY a una densidad final 0.04 (DO_{600}). Sobre cada placa se depositaron 4 discos de 6 mm de diámetro embebidos con 15 μl de: agua, 100 mM, 500 mM y 1 M NiCl_2 o 10, 50 y 100mM CoCl_2 . Las placas se incubaron a 28°C durante 48 hrs y se midió el diámetro (mm) de la zona de inhibición formada.

Análisis bioinformático. Para el análisis bioinformático de la secuencia del genoma de la cepa 3841 de *R. leguminosarum* se utilizó la plataforma RhizoBase <http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/> desarrollada por el Kazusa DNA Research Institute (Japón). Para la comparación de secuencias y búsqueda por similitud de secuencia nucleotídica o aminoacídica se utilizó la plataforma BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov; Altschul et al., 1990). El programa SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>; Hirokawa et al., 1998) se empleó para el análisis de dominios de membrana y KEGG pathway (<http://www.genome.jp/kegg/>) para el análisis de rutas metabólicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los niveles de resistencia a níquel y cobalto en una colección de cepas de *R. leguminosarum*.

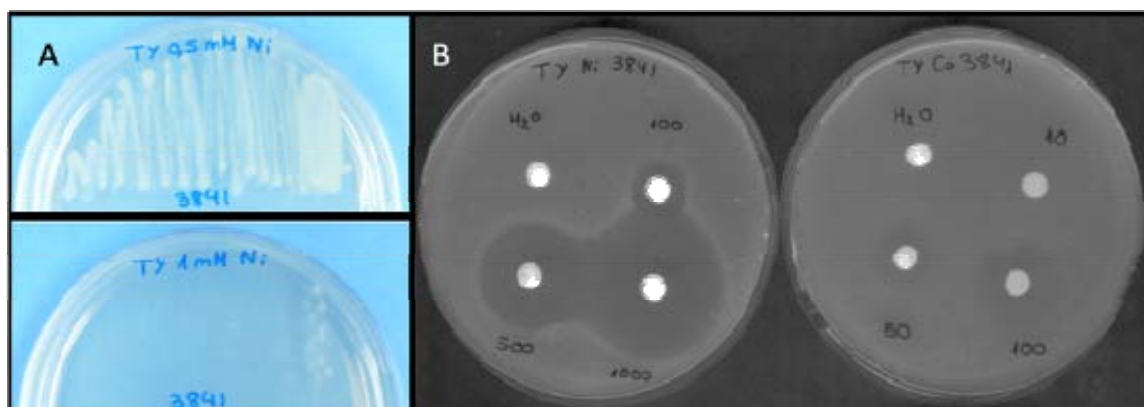
Se seleccionaron 34 cepas catalogadas como *R. leguminosarum* procedentes de diversas localizaciones geográficas y aisladas de los cuatro huéspedes potenciales de *R. leguminosarum*, guisante, lenteja, vicias y almortas, con objeto de determinar su nivel de resistencia a níquel y cobalto. Los ensayos de crecimiento en medio TY suplementado con cantidades crecientes de níquel y de cobalto revelaron que las concentraciones



mínimas inhibitorias de níquel en las cepas analizadas oscilan entre 0.5 y 2.5 mM (Figura 1A). La cepa UPM1137 fue una de las más resistentes a níquel creciendo óptimamente en concentraciones 1,5 mM NiCl_2 y parcialmente en 2,0 mM con una CIM de 2,5 mM. Los resultados del crecimiento en medios suplementados con cobalto revelaron que las concentraciones mínimas inhibitorias a este metal oscilaban entre 0,3 y 0,5 mM CoCl_2 . Todas las cepas crecieron a 0,2 mM y ninguna a 1 mM CoCl_2 .

Con objeto de proporcionar un valor cuantificable de los niveles de resistencia a níquel y cobalto se utilizó el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). En este ensayo, la difusión del metal depositado en el filtro a través del medio produce un gradiente de concentración que determina el crecimiento de las cepas en función de su nivel de resistencia al metal (Figura 1B). La medida de la zona de inhibición generada alrededor del filtro nos permitió cuantificar los niveles de resistencia a níquel y cobalto en la colección, siendo nuevamente la cepa UPM1137 la que presentó menores diámetros de zona de inhibición y, por tanto, una de las más resistentes a ambos metales, mientras que la cepa 3841 presentó unos niveles intermedios de resistencia.

Figura 1. Medida de los niveles de resistencia a níquel y cobalto en *R. leguminosarum* mediante ensayos de crecimiento en placa (A) y difusión en disco (B).



Análisis bioinformático del genoma de *R. leguminosarum* 3841 para la identificación de sistemas génicos potencialmente implicados en homeostasis a metales pesados.

Para el análisis bioinformático de la secuencia del genoma de la cepa 3841 de *R. leguminosarum* se utilizó la plataforma RhizoBase. Esta base de datos proporciona el acceso a la mayoría de las secuencias de genomas de Rhizobiaceas y organismos diazotróficos afines disponibles en este momento y permite la búsqueda de secuencias por similitud o palabras claves. Además proporciona información sobre los contextos genómicos de genes de interés en ese organismo y permite el acceso a programas de análisis de secuencia nucleotídica y aminoacídica como BLAST, SOSUI y KEGG.

El genoma de la cepa 3841 de *R. leguminosarum* tiene descritos 4797 genes en su cromosoma y un total de 2539 repartidos en seis plásmidos de tamaño variable (Young *et al.*, 2006). La búsqueda de sistemas génicos potencialmente implicados en homeostasis a metales pesados partió con una recopilación de genes según su definición en la base de datos RhizoBase obtenidos mediante búsquedas por palabras clave relacionadas con homeostasis a metales. En la Tabla 1 se recoge el número de genes identificados en el genoma en cada búsqueda. Para todos los genes seleccionados se analizó su homología con sistemas de homeostasis (sistemas de entrada y salida de metales, etc...) y sus



contextos genómicos, con objeto de eliminar sistemas implicados en transporte de sustancias no relacionadas con metales. Como resultado de este análisis se seleccionaron 81 genes candidatos, de los cuales 65 se localizan en el cromosoma y el resto en plásmidos. Dado que algunos de los genes identificados son contiguos y probablemente pertenecientes al mismo operón, es lógico pensar que estén implicados en el mismo proceso. Así, el número final de sistemas génicos potencialmente implicados en homeostasis a metales se redujo a 48. En base a las similitudes de secuencias obtenidas, sólo seis sistemas (RL1175-RL1178; RL1350-RL1351; RL3518; RL4159; pRL90274) parecen estar claramente implicados en homeostasis de níquel y/o cobalto, y serán objeto de un estudio más detallado en un futuro.

Tabla 1. Genes potencialmente implicados en homeostasis de metales que han sido identificados en el genoma de *R. leguminosarum* 3841

Palabra clave	Nº genes identificados*	Nº genes seleccionados*
Nickel	1	1
Cadmium	1	1
Arsenic	2	1
Zinc	5	5
Cobalt	8	4
Copper	11	11
Resistance	19	7
Efflux	47	13
Cation	69	21
Transporter	885	40

* Algunos genes pueden aparecer en dos búsquedas diferentes

CONCLUSIONES

Se han analizado los niveles de resistencia a níquel y cobalto de una colección de cepas de *R. leguminosarum* identificándose la cepa UPM1137 aislada de suelos ultramáficos como la más resistente a estos metales, mientras que la cepa 3841 presenta unos niveles medios de resistencia. La búsqueda de sistemas génicos potencialmente implicados en homeostasis de metales en el genoma de *R. leguminosarum* 3841 ha permitido seleccionar 81 genes candidatos, de los cuales seis parecen estar específicamente implicados en homeostasis de níquel.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a todos los integrantes del Laboratorio 251 y 271 del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP) de la UPM el interés y la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). J. Mol. Biol., 215: 402-410.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., y Turck, M. (1966). Am. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
- Beringer, J.E., (1974). J.G. Microbiol., 84: 188-198.
- Chaudri, A.M. Celine, M., Allain, A., Barbosa-Jefferson, V.L., Nicholson, F.A., Chambers, B.J., McGrath, S.P., (2000). Plant Soil., 221: 167-179.
- Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S.P., (1998). Soil Biol Biochem, 30: 1389-1414
- Hirokawa T., Boon-Chieng S., and Mitaku S., Bioinformatics, 14 378-9 (1998)
- Pereira, S.I.A., Lima, A.I.G., Figueira, E.M.D.A.P., (2006). Appl. Soil Ecol., 33: 286-293.
- Verma, D.P., Hu, A., y Zhang, M. (1992). Physiol. Plant. 85:253-265.
- Vincent, J.M., (1970). Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Young, J.P., Crossman, L.C., Johnston, A.W.B., Thomson, N.R. y col. (2006). Genome Biol. 7: R34.